

PAT-NO: JP407274996A

DOCUMENT-IDENTIFIER: JP 07274996 A

TITLE: METHOD FOR OBSERVING FUNGUS EXISTING  
ON KERATIN LAYER OF SKIN

PUBN-DATE: October 24, 1995

INVENTOR-INFORMATION:

NAME

KAWASHIMA, TADAOKI  
ARAKI, HIROMITSU

ASSIGNEE-INFORMATION:

NAME

POLA CHEM IND INC

COUNTRY

N/A

APPL-NO: JP06090569

APPL-DATE: April 5, 1994

INT-CL (IPC): C12Q001/04

ABSTRACT:

PURPOSE: To provide a method for rapidly and simply observing a fungus existing on a keratin layer of skin.

CONSTITUTION: A keratin layer of skin is stuck to a tacky tape which is slightly soluble in an alkali solution and a dyeing solution and is hardly dyed, the keratin layer is treated with an alkali solution and dissolved. A fungus in the keratin layer is dyed with a dyeing solution and the dyed fungus is observed by a microscope. Or gold is deposited on a tacky tap to which the

keratin layer of skin is stuck and the deposited tacky tape  
is observed by a  
scanning electron microscope.

COPYRIGHT: (C) 1995, JPO

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平7-274996

(43) 公開日 平成7年(1995)10月24日

(51) Int.Cl.<sup>6</sup>

C 1 2 Q 1/04

識別記号

片内整理番号

6807-4B

F I

技術表示箇所

審査請求 未請求 請求項の数 4 F D (全 5 頁)

(21) 出願番号 特願平6-90569

(22) 出願日 平成6年(1994)4月5日

(71) 出願人 000113470

ポーラ化成工業株式会社

静岡県静岡市弥生町6番48号

(72) 発明者 川島 忠興

神奈川県横浜市戸塚区柏尾町560ポーラ化成工業株式会社戸塚研究所内

(72) 発明者 荒木 啓光

神奈川県横浜市戸塚区柏尾町560ポーラ化成工業株式会社戸塚研究所内

(74) 代理人 弁理士 遠山 勉 (外2名)

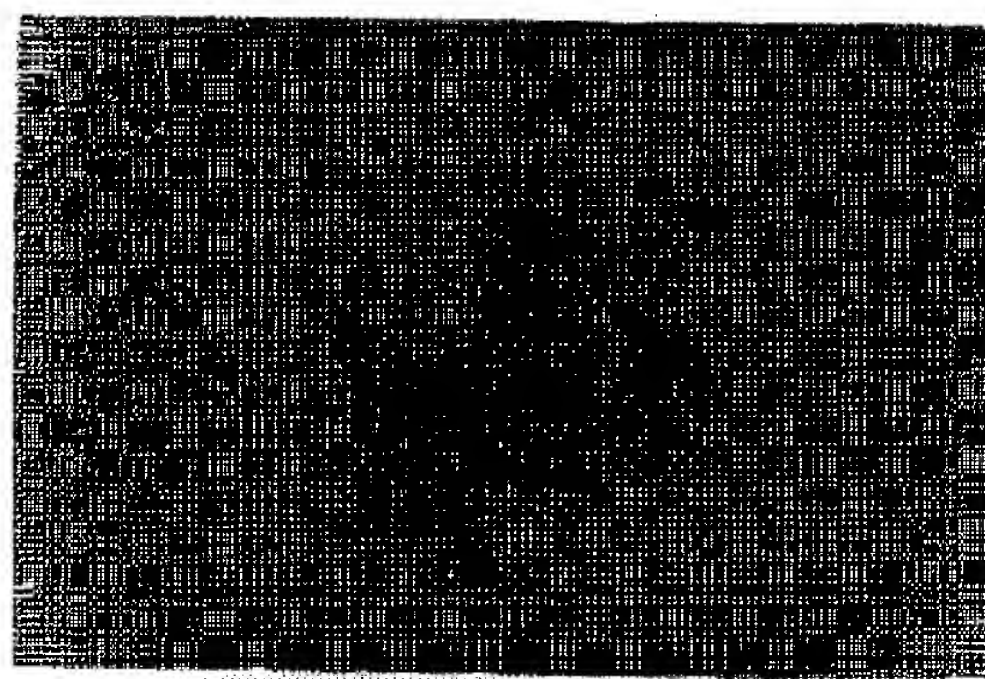
(54) 【発明の名称】 皮膚角質層に存在する真菌の観察法

(57) 【要約】

【目的】 迅速かつ簡便に皮膚角質層に存在する真菌を観察する方法を提供する。

【構成】 アルカリ溶液及び染色液に難溶であって染色されにくい粘着テープに皮膚角質層を付着させ、この角質層をアルカリ溶液で処理して溶解させた後、角質層中の真菌を染色液で染色し、これを顕微鏡観察する。あるいは、皮膚角質層を付着させた粘着テープを金蒸着し、走査型電子顕微鏡観察する。

顕微鏡用写真



写真

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 アルカリ溶液及び染色液に難溶であって染色されにくい粘着テープに皮膚角質層を付着させ、この角質層をアルカリ溶液で処理して溶解させた後、角質層中の真菌を染色液で染色し、これを顕微鏡観察することを特徴とする皮膚角質層に存在する真菌を観察する方法。

【請求項2】 前記アルカリが、水酸化カリウムであり、前記染色が、インク染色、ギムザ染色、ラクトフェノールコットン青染色、ヘマトキシリン染色、エオシン染色、グリドリイ染色、グラム染色、グロコット染色、ベスト・カルミン染色、ムチカルミン染色、コロイド鉄染色、PAS染色から選ばれる1種又は2種以上であり、粘着テープが天然ゴム又はその誘導体、SBR系ゴム、NBR系ゴム、ブタジエンービニルピリジン系ゴム、ブチルゴム、クロロプレン系ゴム、再生ゴム、シアノアクリレート系ゴム、アラビアゴム、トラガントゴムから選ばれる1種又は2種以上をコーティングしたプラスチック素材である請求項1記載の皮膚角質層に存在する真菌を観察する方法。

【請求項3】 粘着テープに皮膚角質層を付着させ、テープの皮膚角質層が付着した側を金蒸着し、これを走査型電子顕微鏡観察することを特徴とする皮膚角質層に存在する真菌を観察する方法。

【請求項4】 請求項1又は3において、窓孔を有し、この窓孔に対応するように粘着テープを貼着したホルダーを用意し、粘着テープの粘着面をホルダーごと皮膚に押し付け、次いでホルダーごと皮膚から粘着テープを剥がすことにより粘着テープに皮膚角質層を付着させることを特徴とする皮膚角質層に存在する真菌を観察する方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、皮膚角質層に存在する真菌を観察する方法に関し、詳しくは、水虫等の皮膚の感染症を診断するために皮膚の角質層中に存在する真菌を観察する方法に関する。

## 【0002】

【従来の技術】水虫（白癬）、皮膚カンジダ症、癬風等の表在性の皮膚真菌症は、頭部、体幹、陰股部、臀部、足及び手掌等に白癬菌等の真菌が繁殖し、紅斑、鱗屑、丘疹、小水疱等が生じる皮膚疾患である。治療法は抗真菌外用剤を塗布しているのが現状である。本疾患の治療法を決定するにあたり、脂漏性湿疹、尋常性乾癬、慢性湿疹、進行性指掌角皮症等との鑑別を行う必要がある。これらの湿疹を抑えるためにはステロイド等の外用剤の投与が必須であるが、皮膚真菌症の治療には、ステロイド剤などの皮膚の抵抗性を弱める薬剤を使用すべきでなく、誤診に基づくステロイド剤の乱用は真菌症の悪化をもたらすからである。

【0003】真菌症の鑑別診断は、真菌の存在を証明することにより正確に行うことができる。真菌の検査法としては、(a) KOH法、(b) 塗抹染色法、(c) 分離培養法、(d) 免疫学的診断法、(e) ウッド灯による検査法、(f) 病理学的診断法等が知られている。

【0004】これらの方法で最も重要なことは、皮疹部位の皮膚の採取法である。鱗屑を含む皮膚の角質層をメスや透明粘着テープ（メンディングテープ：スコッチ社製）で剥離し、それをスライドグラスに角質層が表面になるように両面テープを用いて貼付し、KOH法では、苛性カリ液を滴下し、加温後顕微鏡にて観察する。この粘着テープを用いる方法は、簡便で、小児から材料を採取するのに適し、鱗屑の乏しい癬風病変から材料を採取するのに適している。

【0005】又、テープに付着している粘着物質の種類を変えることにより、皮膚の角質層の採取量を変動させることができるので、角質層の上層部を採取したり、深層部を採取したり、必要に応じて変えることが出来る。これは、真菌が角質層のどの部分に存在していても採取できるものである。

## 【0006】

【発明が解決しようとする課題】上記の方法では、粘着テープをスライドグラスに張りつけてから苛性カリ液を滴下、染色し、加温後顕微鏡にて観察している。したがって、一度スライドグラスにテープを固定してから染色、観察するので、迅速な標本作製が出来ず、患者を待たせてしまっているのが現状であり、また、採取において直接テープを患部にあてることから、患部との接触による感染の懸念もあるので、標本を安全にかつ迅速に作製することが望まれている。本発明はかかる観点からなされたものであり、迅速かつ簡便に皮膚角質層に存在する真菌を観察する方法を提供することを課題とする。

## 【0007】

【問題点を解決するための手段】本発明者は、上記課題を解決するため鋭意検討を行った結果、皮膚角質層を採取した粘着テープをそのまま染色することにより、迅速な観察ができ、さらに粘着テープを貼着したホルダーを予め用意しておく、患部と直接に接触することなく、皮膚角質層の採取やその後の染色操作等が迅速、簡便に行えることを見出し、本発明に至った。

【0008】すなわち本発明は、アルカリ溶液や染色液に難溶であって染色されにくい粘着テープに皮膚角質層を付着させ、この角質層をアルカリ溶液で処理して溶解させた後、角質層中の真菌を染色液で染色し、これを顕微鏡観察することを特徴とする皮膚角質層に存在する真菌を観察する方法である。

【0009】また本願発明は、粘着テープに皮膚角質層を付着させ、テープの皮膚角質層が付着した側を金蒸着し、これを走査型電子顕微鏡観察することを特徴とする皮膚角質層に存在する真菌を観察する方法を提供する。

【0010】さらに、上記発明の態様として、これらの方法において、窓孔を有し、この窓孔に対応するように粘着テープを貼着したホルダーを用意し、粘着テープの粘着面をホルダーごと皮膚に押し付け、次いでホルダーごと皮膚から粘着テープを剥がすことにより粘着テープに皮膚角質層を付着させることを特徴とする皮膚角質層に存在する真菌を観察する方法を提供する。

【0011】以下、本発明を詳細に説明する。本発明に用いる粘着テープは、テープ自体の材質としては、一般的又は工業的に使用されているものでよく、アルカリや染色液に難溶で染色しにくい材質であれば特に制限されない。具体的には、セロファン、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリ塩化ビニル、ポリエステル、ふっ素樹脂等のプラスチック素材等が挙げられる。

【0012】一方、粘着テープの粘着物質としては、アルカリや染色液に難溶で染色しにくい樹脂又は高分子化合物が用いられ、具体的には、ポリ酢酸ビニル、ポリビニルアルコール、ポリビニルアセタール、ポリ塩化ビニル、ポリ塩化ビニリデン、ポリビニルエーテル、ポリブテン、アスファルト、及び、天然ゴム又はその誘導体、SBR系ゴム、NBR系ゴム、ブタジエン-ビニルピリジン系ゴム、ブチルゴム、クロロプレン系ゴム、再生ゴム、シアノアクリレート系ゴム、アラビアゴム、トラガントゴム等のゴム質などが挙げられ、これらの1種又は2種以上よりなる混合物を単独あるいは他の基材に含有せしめたものが用いられる。

【0013】上記の粘着物質のうちでも、天然ゴム又はその誘導体、SBR系ゴム、NBR系ゴム、ブタジエン-ビニルピリジン系ゴム、ブチルゴム、クロロプレン系ゴム、再生ゴム、シアノアクリレート系ゴム、アラビアゴム、トラガントゴム等のゴム質はテープを剥がす際の剥離性及び角質層を変化させないという点で本発明方法において好適に使用される。

【0014】本発明においては、このような粘着性物質を前記素材のテープにコーティングして得られる粘着テープを用いるが、市販のセロハンテープ等を用いてもよい。皮膚角質層内に存在する真菌を観察するにあたっては、粘着テープに皮膚角質層を付着させる。例えば、粘着テープの粘着面を皮膚に押し付け、次いで皮膚から粘着テープを剥がすことにより、粘着テープに皮膚角質層を採取することができる。

【0015】また、窓孔を有し、この窓孔に対応するように粘着テープを貼着したホルダーを用意しておく、ホルダーごと粘着テープを皮膚に押し付け、剥がすことができ、ホルダーの枠をてことして利用すると、一定の力で一定の方向から剥がすことができ、常に一定の角層の一部をテープ上に採取することが、簡便に行える。また、ホルダーの窓孔の周囲に目盛りを付けておくと、粘着テープを適当な大きさに切断する際に目安となる。さらに、窓孔の粘着テープを貼着して逆側に窓孔よりも大

きなリケイシを貼付しておき、ホルダー全体をストッパー付のビニール袋等に入れておくと、粘着面やホルダー汚染せずに保存することができ、携帯性も向上する。

【0016】粘着テープの粘着面に皮膚角質層を採取した後、この角質層を15~30%水酸化カリウム、15~30%水酸化ナトリウム、あるいはこれらに20~40%のジメチルスルフォキシドを加えた溶液等のアルカリ溶液で処理して溶解させる。これは、角質層内に存在する真菌を染色しやすくするためである。前記アルカリとしては、特に水酸化カリウムが好ましい。

【0017】続いて、角質層内に存在する真菌を、インク染色、ギムザ染色、ラクトフェノールコットン青染色、ヘマトキシリン染色、エオシン染色、グリドリイ染色、グラム染色、グロコット染色、ベスト・カルミン染色、ムチカルミン染色、コロイド鉄染色、PAS染色などの真菌を染色できる染色液を用いて染色する。染色は単独でもよく、必要に応じて2種類以上の染色を行ってもよい。こうして染色した後に、カバーガラスを掛けて顕微鏡観察することにより、真菌の有無を確認することができる。

【0018】また、角質層を採取した粘着テープを適当な大きさに切断し、走査型電子顕微鏡試料台に両面テープ等で固定し、金蒸着した後走査型電子顕微鏡により観察すると、真菌存在の有無のみでなく、その形態を詳細に観察することができる。

【0019】一度、角質層を粘着テープに採取すると、光学顕微鏡及び走査型電子顕微鏡の両方による観察標本作製することができる。光学顕微鏡観察により真菌の有無を確認し、真菌が存在することが確認された後に、走査型電子顕微鏡を用いてその形態を観察することにより、真菌の同定の目安とすることができる。

【0020】

【実施例】次に、本発明の方法の実施例を示す。尚、本実施例ではホルダーを使用した、ホルダーを使用しなくても同様に標本作成し、皮膚角質層内の真菌を観察することができる。

【0021】

【実施例1】7.6cm×2.6cmの長方形形状であり、端部に3.5cm×2.0cmの長方形の窓孔2を有するホルダー1(図1)に、窓孔2に対応するように4.0cm×2.6cmのセロハンテープ3(市販の粘着性セロハンテープを切断したもの)を貼着したものを用意した。ホルダー1の窓孔2の枠には、1mm毎に目盛り4が付してある。

【0022】このホルダー1を、粘着テープの粘着面が接するようにカンジダ性間擦疹の病変部に指で押し付け、軽く2~3回擦ってセロハンテープを皮膚に密着せしめ、ついで、ホルダーの枠をてことして利用し、一定の力で一定の方向から剥がした。セロハンテープの一部(5×4mm)を切り取り、20%ジメチルスルフォキ



5

サイドを含む20%水酸化カリウム溶液を2、3滴、滴下させ、2～3分放置して角質層を溶解させた。続いて染色液（青インク）を滴下し、真菌の染色を行った。染色後、粘着テープにカバーガラスを掛けて光学顕微鏡観察した結果、真菌（カンジダ アルビカンス(Candida albicans)）の存在が確認された。写真撮影を行った結果を図2に示す。

【0023】

【実施例2】癬風の病変部から実施例1と同様にして角質層を採取したセロファンテープの一部（6×5mm）を、走査型電子顕微鏡用試料台（15mmφ）に両面テープで固定し、E-101型イオンスパッタ（日立製）を用いて金蒸着した。これを走査型電子顕微鏡にて観察し、真菌（マラセジア ファーフアー(Malassezia furfur)）の有無及び形態を観察した。写真撮影を行った結果を図3、4に示す。尚、図3はマラセジア ファーフアーの菌糸を、図4は胞子を各々観察した結果である。

【0024】

【発明の効果】本発明により、被検者から皮膚角質層を

6

非侵襲的に、簡単かつ均一に採取することができ、角質層内に存在する真菌を観察することができる。本発明は、皮膚真菌症の診断に有効に利用できる。

【図面の簡単な説明】

【図1】ホルダーの一例を示す斜視図。

【図2】本発明の方法に用いた角質層標本（実施例1）の顕微鏡写真（倍率700倍）である（生物の形態）。

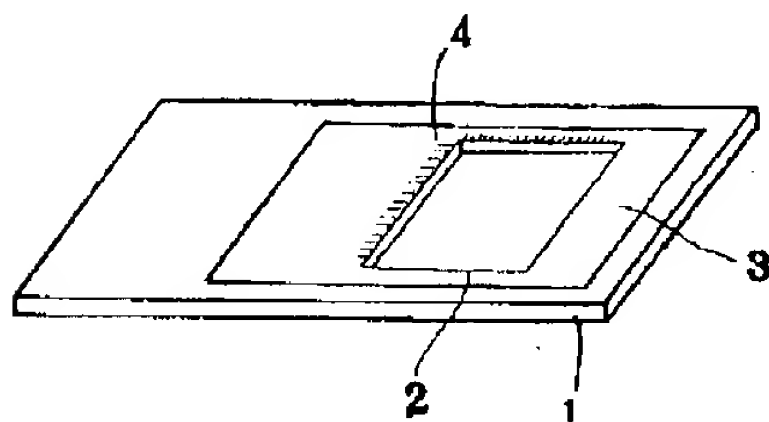
【図3】本発明の方法に用いた皮膚角質標本（実施例2）の走査型電子顕微鏡写真（倍率5000倍）である（生物の形態）。

【図4】本発明の方法に用いた皮膚角質標本（実施例2）の走査型電子顕微鏡写真（倍率2200倍）である（生物の形態）。

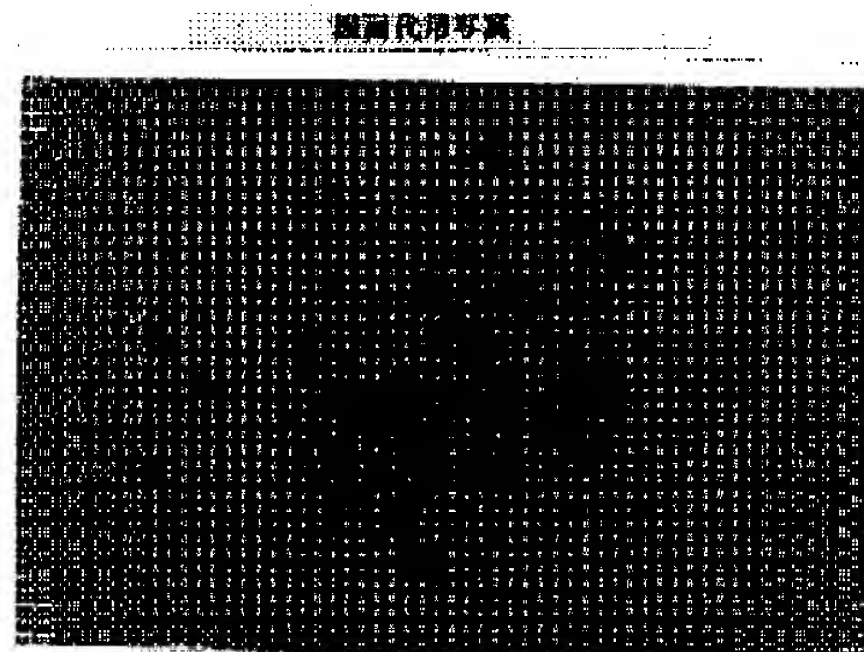
【符号の説明】

1. ホルダー
2. 窓孔
3. 粘着物質を塗布したテープ
4. 目盛り

【図1】



【図2】



写真

【図3】



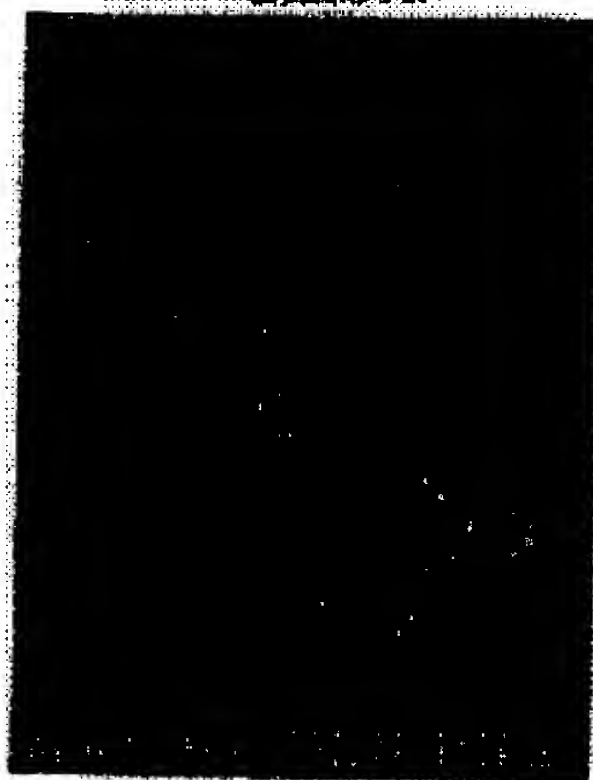
写真

(5)

特開平7-274996

【図4】

図面位相等価



写真